

基于铜绿假单胞菌群体感应系统的潜在抗菌中草药筛选研究

高磊^{1,2},童浩文^{1,2},梁跃辉^{1,2},赵弘毅²,刘海波²,刘旭^{1*}¹广西大学医学院新药筛选中心;²广西大学化学化工学院,南宁 530004

摘要:铜绿假单胞菌借助体内的群体感应系统,促进多种毒力因子的表达,产生耐药性,已成为治疗临床感染的一大难题,寻找新的抗菌药物迫在眉睫。本文选取广西常见中草药 2 733 味,建立活性成分库。将库中的小分子与群体感应通路中较为重要的 5 个耐药相关蛋白进行柔性对接,从中筛选中草药,最终得到小分子配体 17 个,对应得到可作为潜在群体感应抑制剂的中药材 7 味,分别是五倍子、苈麻根、羊蹄甲、火炭母、叶下珠、水松、多花野牡丹。相关耐药株抑菌试验证实了所选中药的有效性。

关键词:铜绿假单胞菌;群体感应;抑制剂;抑菌试验;分子对接

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)5-0772-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.5.005

Screening of potential antibacterial Chinese herbal medicines based on quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*

GAO Lei^{1,2}, TONG Hao-wen^{1,2}, LIANG Yue-hui^{1,2}, ZHAO Hong-yi², LIU Hai-bo², LIU Xu^{1*}¹Center for Drug Screening, Medical College of Guangxi University;²College of Chemistry and Chemical Engineering of Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* promotes the expression of a variety of virulence factors and develops drug resistance with the help of the quorum sensing system *in vivo*, which has become a major problem in the treatment of clinical infections, and it is extremely urgent to find new antibacterial drugs. 2 733 common Chinese herbal medicines in Guangxi were selected in this work, and the active constituent library was established. After that, five important drug-resistant relative proteins in the quorum sensing were selected, and then they were docked with molecules, excepting to screen Chinese herbal medicine. Finally, the results showed that 17 ligands could be screened and 7 corresponding Chinese herbs could be applied as the potential quorum sensing inhibitors: *Galla Chinensis*, *Rhizoma et Radix Boehmeriae*, *Radix Bauhiniae Purpureae*, *Herba Polygoni Chinensis*, *Herba Phyllanthi Urinariae*, *Folium Glyptostrobi Pensilis*, *Herba Melastomatis Polyanthi*, respectively. The effectiveness of the selected traditional Chinese medicine was proved by the antimicrobial test of drug-resistant strains.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing; inhibitors; bacteriostasis test; molecule docking

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)与多种感染有关^[1]。近期研究发现在抗生素治疗时,PA的耐药性通过群体感应增强^[2]。近年来,由于抗生素的广泛使用,PA对多种抗菌药物产生耐药性,使得临床PA感染的治疗难度大幅增加。寻求抑制耐药PA的新药物成为全球亟待解决的问题。鉴于我区中医药资源丰富,本课题考虑从中药出发,以群

体感应的关键蛋白作为靶点。利用分子对接的方法,在中药化合物库中搜索与活性位点亲和力和较高的配体分子。借助抑菌试验对虚拟筛选结果验证,寻找临床上可抑制PA耐药的中药,以配合抗生素联用。

而群体感应(quorum sensing, QS)是细菌群体协调毒力表达的胞间通讯系统^[3]。机制为五点^[4-6]:(1)外排泵基因过表达;(2)灭活酶使药物水解;(3)生物被膜形成;(4)作用靶点突变;(5)外膜通透性下降。

PA的群体感应系统至少包含4个子系统^[7]:假单胞菌喹诺酮信号(*Pseudomonas* quinolone signal,

收稿日期:2021-04-21 接受日期:2022-03-11

基金项目:国家自然科学基金(22078073);广西重点研发计划(桂科AB18221121);广西创新驱动发展专项(桂科AA18242040);广西中医药研究院课题(桂中重开201703)

*通信作者 Tel:86-771-3387113;E-mail:wendaoliuxu@163.com

PQS), 综合群体感应信号 (integrated quorum sensing signal, IQS) 以及 LAS 和 RHL 系统。因此, 与传统抗生素相比, 群体感应系统抑制剂 (quorum sensing in-

hibitors, QSIs) 可减弱 PA 的毒性, 降低耐药性避免败血症, 提高抗生素治疗的敏感性。

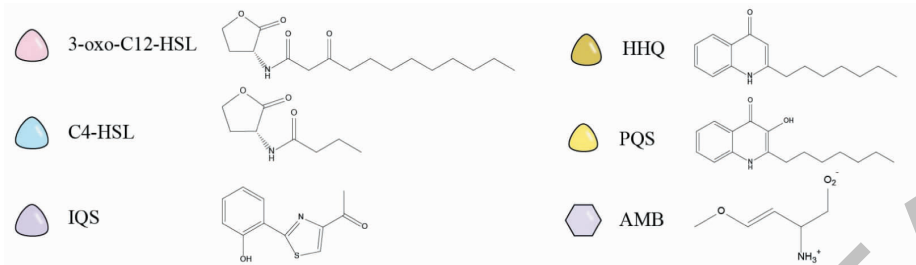


图 1 铜绿假单胞菌 QS 系统主要信号分子结构式

Fig. 1 The molecular structural formulas of QS system's main signaling molecules in *Pseudomonas aeruginosa*

QS 系统间相互作用如图 1、2 所示。LAS 系统的胞间信号分子为 2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮 (3-oxo-C₁₂-HSL), 可正向调节 PQS 系统; RHL 系统的胞间

信号分子为 N-丁酰基-高丝氨酸内酯 (C₄-HSL), 可以负向调节 PQS 系统^[8]。

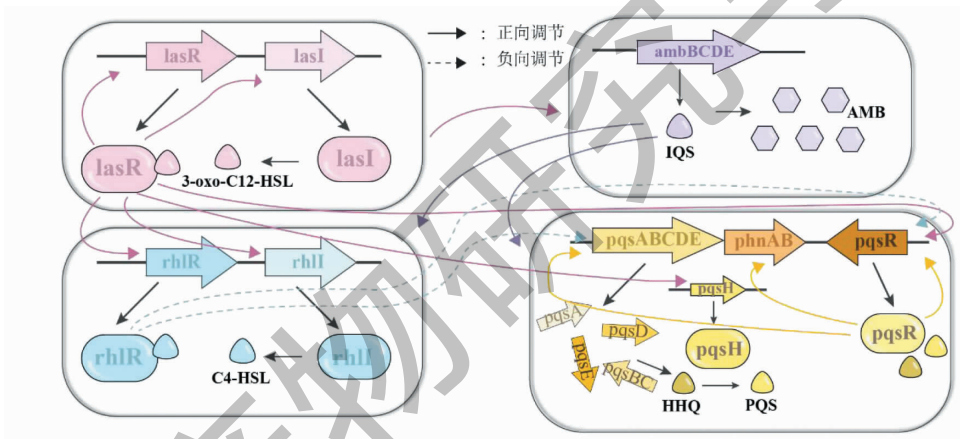


图 2 铜绿假单胞菌 QS 系统之间的相互作用

Fig. 2 Interactions between QS systems of *P. aeruginosa*

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验中草药

选取常见中草药, 共计 2 733 个, 然后记录各味中草药的多个活性成分, 汇总。画出活性分子的结构

构式并优化和保存其立体构型, 建立小分子库, 为后续的分子对接做准备。实验中使用的部分中草药见表 1。实验中使用的部分中草药种属鉴定情况见表 2。本文药材鉴定人是广西国际壮医医院民族药研究所所长黄瑞松教授。

表 1 实验中使用的部分中草药

Table 1 Part of the Chinese herbs used in the experiment

中草药名称 Chinese herbal medicine name					
栀子 Gardeniae Fructus	鱼腥草 Houttuyniae Herba	仙茅 Curculiginis Rhizoma	乌药 Linderae Radix	菟丝子 Cuscutae Semen	天南星 Arisaematis Rhizoma
假山龙眼 Heliciopsis henryi	益母草 Leonuri Herba	土人參 Talini Paniculati Radix	桑叶 Mori Folium	枇杷叶 Eriobotryae Folium	多花野牡丹 Melastomatis Polyanthi Herba

续表 1 (Continued Tab. 1)

中草药名称 Chinese herbal medicine name					
红景天 Rhodiolae Crenulatae Radix et Rhizoma	远志 Polygalae Radix	肉桂 Cinnamomi Cortex	七叶莲 <i>Schefflera arboricola</i> Hagata	射干 Belamcandae Rhizoma	青蒿 Artemisiae Annuae Herba
野菊花 Chrysanthemi Indici Flos	三七 Notoginseng Radix et Rhizoma	榆绿木 <i>Anogeissus acuminata</i>	麦冬 Ophiopogonis Radix	牡荆叶 Vitidis Negundo Folium	路路通 Liquidambaris Fructus
商陆 Phytolaccae Radix	桑白皮 Mori Cortex	五倍子 Galla Chinensis	刘寄奴 Artemisiae Anomalae Herba	决明子 Cassiae Semen	虎杖 Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
千金子 Euphorbia Semen	山豆根 Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma	苈麻根 Boehmeriae Rhizoma et Radix	苦丁 Picrasmae Ramulus et folium	水松 Glyptostrobi Pensilis Folium	火麻仁 Cannabis Fructus
马齿苋 Portulacae Herba	白芍 Paeoniae Radix Alba	两面针 Zanthoxyli Radix	积雪草 Centellae Herba	古钩藤 Cryptolepis Buchanani Radix	瓜蒌 Trichosanthis Fructus
佛手 Citri Sarcodactylis Fructus	牡丹皮 Moutan Cortex	大戟 Euphorbiae Pekinensis Radix	豆蔻 Amomi Fructus Rotundus	诃子 Chebulae Fructus	西青果 Chebulae Fructus Immaturus
赤芍 Paeoniae Rubra Radix	莪术 Curcuma Rhizoma	芦荟 Aloe	丁香 Caryophylli Flos	橘红 Citri Exocarpium Rubrum	羊蹄甲 Bauhiniae Purpureae Radix
小茴香 Foeniculif Fructus	薏苡仁 Coicis Semen	一点红 Emiliae Sonchifoliae Herba	滨盐肤木 <i>Rhus chinensis</i> Mill	泽泻 Alismatis Rhizoma	紫金牛 Ardisiae Japonicae Herba
叶下珠 Phyllanthi Urinarise Herba	香附 Cyperi Rhizoma	阳桃 Averrhoae Carambolae Fructus	竹茹 Bambusae Caulis in Taenias	火炭母 Polygoni Chinensis Herba	薯蓣 Dioscoreae Cirrhosae Rhizoma

表 2 实验中使用的部分中草药种属鉴定表

Table 2 Identification list of the partial Chinese herbs used in the experiment

药材名称 Chinese herbal medicine name	外观 Appearance	别名 Alias	种属 Species	鉴定人 Appraiser
五倍子 Galla Chinensis	主要分为角倍和肚倍两类:角倍,呈菱形,有不规则的钝角状态分枝;肚倍,长圆形或纺锤形囊状,质硬而脆,表面有光泽。	文蛤、百虫仓、百巧煎、梧子	漆树科植物盐肤木 <i>Rhus chinensis</i> Mill.、青麸杨 <i>Rhus potaninii</i> Maxim. 或红麸杨 <i>Rhus punjabensis</i> Stew. var. <i>sinica</i> (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿	黄瑞松
苈麻根 Rhizoma et Radix Boehmeriae	多年生草本或亚灌木,高 1~2 m。根呈不规则圆柱形,略弯曲。	家苈麻、野麻、白麻、园麻、青麻	荨麻科植物苈麻 <i>Boehmeria nivea</i> (L.) Gaud. 的干燥根茎及根	
羊蹄甲 Radix Bauhiniae Purpureae	乔木或直立灌木,高 7~10 m 树皮厚,近光滑,灰色至暗褐色。	玲甲花、白紫荆、洋紫荆	豆科 Leguminosae 羊蹄甲属 <i>Bauhinia</i>	
火炭母 Herba Polygoni Chinensis	多年生蔓性草本,长可达 1.5 m,茎圆柱形,略具棱沟,下部质坚实,多分枝。	火炭毛、乌炭子、火炭星	廖科廖属多年生草本植物火炭母的干燥地上部分	
叶下珠 Herba Phyllanthi Urinarise	茎通常直立,基部多分枝,枝倾卧而后上升,枝具翅状纵棱,叶片纸质,因叶柄扭转而呈羽状排列。	珠子草、珍珠草、龙珠草、阴阳草	大戟科叶下珠属一年生草本植物	
水松 Folium Glyptostrobi Pensilis	半常绿性乔木,树皮褐色或灰褐色,裂成不规则条片。内皮淡红褐色,枝稀疏,平展。	水松柏	杉科 Taxodiaceae 水松属落叶或半落叶乔木	
多花野牡丹 Herba Melastomatis Polyanthi	茎钝四棱形或近圆形,分枝多,毛扁平边缘流苏状,叶片坚纸质,卵形或广卵形。	酒瓶果、乌提子、山甜娘	野牡丹科野牡丹属灌木	

1.1.2 涉及蛋白质

从蛋白质数据库(RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)中确定 PA 群体感应系统相关的重点蛋白,以 PDB 格式保存。分别是以 PDB 号 5EOE 为代表的 BEL-1 型蛋白^[9];以 4HEF 为代表的 AmpC 型蛋白^[5];以 4ZZL 为代表的外排泵操纵子抑制因子^[4];以 4NR0 为代表的烯基还原酶^[2];以 3H78 为代表的喹诺酮类生物合成酶^[10]。这些是多篇文献已发现并反复提及的群体感应关键蛋白,对应本文所述的五个群体感应 PA 耐药机制和耐药系统间级联调控^[11]。

1.1.3 主要仪器及设备

HJ-VD-650 型洁净工作台(上海苏净实业有限公司);722G 型可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);DSX-280B 型手提式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);ZHUY-2 102 型双层恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);D1008 型高速微量离心机(京君龙实验仪器(北京)有限公司);Vortex-Genie2 型涡旋混合器(美国 scientific industries 公司);TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司);DRP-9032 型电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);JY92-III 型超声波细胞破碎机(上海皓庄仪器有限公司);DHG-9007A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);DYCZ-24N 型电泳仪(北京六一仪器厂);WD-2012A 型自动酶标仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.1.4 主要试剂

LB 肉汤、技术琼脂粉(北京陆桥技术有限公司);氯化钠(天津市科密欧化学试剂有限公司);Tris、Glycine、SDS(北京 Solarbio 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分子对接

本工作采用 Molecular Operating Environment

(MOE 2015) 软件,DELL R640 商用服务器(20 CPU,DDR 2 666)为软硬件基础。先对上述 5 个蛋白进行预处理,步骤为先质子化,再优化蛋白质三维结构将体系能量降低,最后删除非键合水分子,加氢等。预处理后的蛋白质与中草药活性分子依次对接。MOE 软件计算工作在中科院上海有机所进行,该软件的优点是可以将蛋白和小分子配体进行准确高效地虚拟对接。

以每个活性化合物改变 100 次空间构型和靶标对接,使用配体扩张法获得活性位点,采用柔性对接的方法,对接运行次数每个 1 000 次。根据多次对比各个打分函数后,确定以 London dG 为打分函数 S (Score)最为适宜。因其能较好表征柔性对接前后体系吉布斯自由能的微小变化值,从而在热力学角度解释配体与受体的结合强弱。对接计算结束,按 S 从低到高排序查看。根据打分值,筛选配体分子,S 的数值越低,说明此配体与此蛋白质作用活性越高,此配体小分子成为铜绿假单胞菌 QSIs 的潜力越大。

1.2.2 耐药性分析方法

取 59 株适量的冻存耐药 PA 菌种,分别接种到 50 mL 的离心管中(含有 20 mL 的 LB 液体培养基),在 37 °C、120 r/min 的条件下培养 12 h。之后从中取适量菌液接种到新的 50 mL 离心管中(含 20 mL 的 LB 液体培养基),在 37 °C、120 r/min 的条件下培养 12 h,待用。另外,准备 1 株野生菌 PAO1,留存备用。

2 结果和分析

2.1 对接结果与分析

将上文所提 5 个蛋白质跟配体小分子进行对接,MOE 计算后,得到 17 个的优秀小分子配体(见表 3),对应得到 7 个代表性中草药,它们分别为:五倍子、苎麻根、羊蹄甲、火炭母、叶下珠、水松、多花野牡丹。其中,部分药物活性成分和靶蛋白的对接过程,见图 3 所示。

表 3 分子对接计算结果

Table 3 The results of molecular docking

药材名称 Name of Chinese herbal	主要活性成分 Main active composition	最小结合能 Minimum binding energy(kcal/mol)				
		3H78	4HEF	4NR0	4ZZL	5EOE
五倍子 Galla Chinensis	没食子酸丙酯 Propylgallate	-17.29	-17.01	-17.89	-17.80	-17.28
	没食子酸辛酯 Octyl gallate	-14.58	-16.66	-15.79	-16.80	-18.31
苎麻根 Rhizoma et Radix Boehmeriae	2,4,4'-三羟基查尔酮 2,4,4'-Trihydroxychalcone	-14.85	-14.58	-17.13	-15.82	-17.45

续表 3 (Continued Tab. 3)

药材名称 Name of Chinese herbal	主要活性成分 Main active composition	最小结合能 Minimum binding energy (kcal/mol)				
		3H78	4HEF	4NR0	4ZZL	5EOE
羊蹄甲 Radix Bauhiniae Purpureae	7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,8 <i>R'</i> -(-)-5-甲氧基落叶松树脂-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,8 <i>R'</i> -(-)-5-Methoxylariciresinol-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	-16.69	-16.51	-21.06	-17.53	-16.81
	4-羟基-3-甲氧基苯甲酸 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid	-14.21	-16.38	-14.62	-16.39	-15.95
火炭母 Herba Polygoni Chinensis	3- <i>O</i> -甲基没食子酸 3- <i>O</i> -Methylo-gallic acid	-16.97	-16.72	-14.51	-17.07	-20.93
	3,3'-二甲基鞣花酸 3,3'- Dimethylellagic acid	-14.92	-13.58	-14.73	-14.06	-17.33
	邻苯二甲酸 Phthalic acid	-12.90	-16.11	-12.32	-17.18	-16.27
	山奈酚-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸 Kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronic acid	-14.77	-16.26	-17.84	-21.85	-19.81
叶下珠 Herba Phyllanthi Urinaris	叶黄素 A Phyllanthusiin A	-21.70	-27.88	-19.96	-22.47	-20.45
	叶黄素 B Phyllanthusiin B	-20.74	-18.86	-19.05	-23.04	-23.22
	叶黄素 C Phyllanthusiin C	-20.53	-20.63	-20.04	-24.27	-21.88
	叶黄素 D Phyllanthusiin D	-20.29	-23.75	-20.16	-22.80	-20.00
	没食子酸-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -没食子酰基)-葡萄糖苷 Gallic acid-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-glucoside	-23.92	-21.06	-19.13	-20.75	-22.54
水松 Folium Glyptostrobi Pensilis	异银杏 Isoginkgetin	-15.23	-16.95	-18.00	-16.08	-18.92
	对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	-13.34	-12.71	-14.83	-13.22	-14.41
多花野牡丹 Herba Melastomatis Polyanthi	3- <i>O</i> -甲基鞣花酸葡萄糖苷 3- <i>O</i> -Methylellagic acid glucoside	-20.76	-17.40	-18.04	-17.21	-20.44

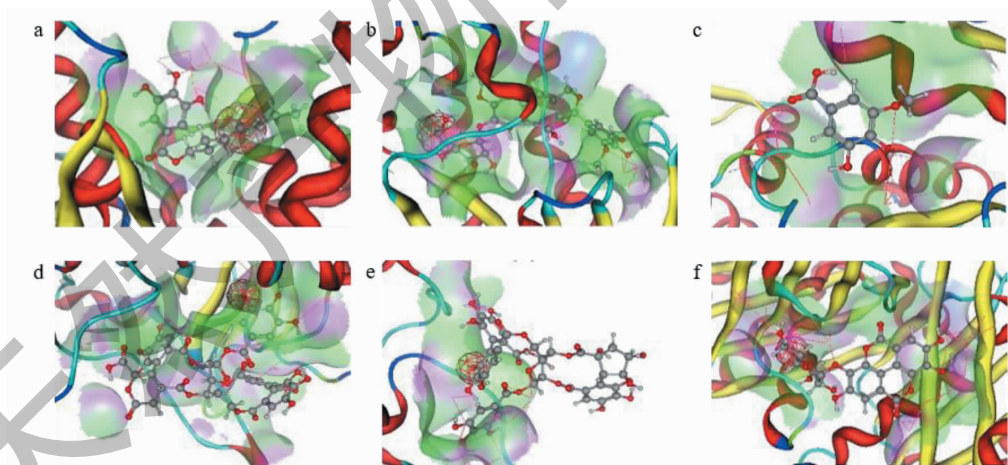


图 3 蛋白质和分配体小分子之间的 3D 分子对接图

Fig. 3 The 3D molecular docking diagram between proteins and ligands

注: a:5EOE 和 octyl gallate; b:4NR0 和 7*S*,8*R*,8*R'*-(-)-5-methoxylariciresinol-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside; c:5EOE 和 3-*O*-methylo-gallic acid; d: 4HEF 和 phyllanthusiin A; e:4ZZL 和 phyllanthusiin C; f:3H78 和 3-*O*-methylellagic acid glucoside. Note: a:5EOE and octyl gallate; b:4NR0 and 7*S*, 8*R*,8*R'*-(-)-5-methoxylariciresinol-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside; c:5EOE and 3-*O*-methylo-gallic acid; d:4HEF and phyllanthusiin A; e:4ZZL and phyllanthusiin C; f:3H78 and 3-*O*-methylellagic acid glucoside.

以 5EOE 和没食子酸辛酯为例,由图 3 可知,没食子酸辛酯分子占据了雪茄型疏水性口袋,与周围

的氨基酸残基相互作用。其中除了疏水作用,谷氨酸残基(Glu-A84)和苏氨酸残基(Thr-A111、Thr-A113)

通过溶剂中的水分子,与酚羟基形成间接氢键。这些作用力使得配体与5EOE亲和力高,结合力较强,表现出较不错的对接得分。

QSIs可以在不影响细菌生长的同时,抑制其毒力的形成,达到抗感染的目的。分子对接表明,代表中草药小分子有能力和PA中的群体感应通路关键蛋白形成复合物,与它们的内源性配体竞争,降低耐药性。有望成为潜在的铜绿假单胞菌QSIs。从而可大致推断出,含较丰富此类小分子的中草药,或可直接用于PA耐药株,甚至应用于临床中药伍配,与抗生素联用降低耐药株的活性,提高疗效。

2.2 中草药抑菌试验

对59株临床耐药菌株和1株野生菌PAO1进行了药敏分析显示60株铜绿假单胞菌对阿莫西林、氨苄西林、头孢曲松、头孢唑林、头孢西丁、呋喃妥因、复方新诺明和替加环素是完全耐药的;而对野生株PAO1敏感的抗生素有头孢哌酮、氨曲南、头孢他啶、庆大霉素、左氧氟沙星、妥布霉素以及他唑巴坦(见表4)。通过抗生素药敏试验的结果,选出一株抗药性最强的菌株(#5336)和一株抗药性最弱的菌株(#5685)作为中药抑菌试验的研究对象。

为验证上述计算结果的准确性,进行了抑菌试验和中草药筛选。

表4 60株铜绿假单胞菌药敏实验分析数据

Table 4 Data of drug sensitivity test of 60 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

抗生素 Antibiotic	敏感 Sensitivity	中敏 Mid-susceptibility	耐药 Resistance
头孢哌酮/舒巴坦	20(33.33%)	9(15.00%)	31(51.67%)
阿莫西林/棒酸	-	-	60(100.00%)
阿米卡星	48(80.00%)	-	12(20.00%)
氨苄西林	-	-	60(100.00%)
氨曲南	25(41.67%)	10(16.67%)	25(41.67%)
头孢他啶	44(73.33%)	1(1.67%)	15(25.00%)
环丙沙星	45(75.00%)	2(3.33%)	13(21.67%)
头孢曲松	-	-	60(100.00%)
头孢唑林	-	-	60(100.00%)
头孢吡肟	35(58.33%)	11(18.33%)	14(23.33%)
头孢西丁	-	-	60(100.00%)
庆大霉素	42(70.00%)	4(6.67%)	14(23.33%)
亚胺培南	43(71.67%)	2(3.33%)	15(25.00%)
左氧氟沙星	46(76.67%)	3(5.00%)	11(18.33%)
呋喃妥因	-	-	60(100.00%)
哌拉西林	40(66.67%)	1(1.67%)	19(31.67%)
复方新诺明	-	-	60(100.00%)
替加环素	-	-	60(100.00%)
妥布霉素	46(76.67%)	-	14(23.33%)
他唑巴坦	34(56.67%)	13(21.67%)	13(21.67%)

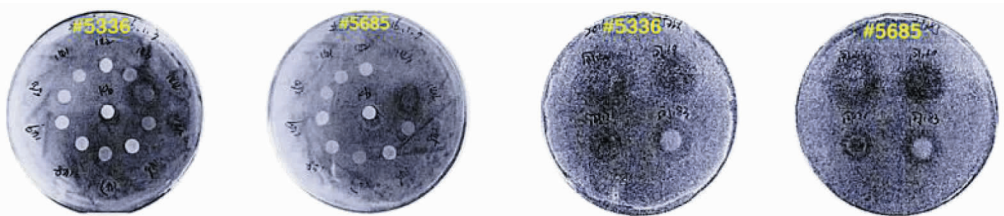


图4 纸片法(左两纸)和牛津杯法(右两纸)筛选试验结果示例图(#5336、#5685菌株)

Fig. 4 The picture of disk diffusion method (Left two) and oxford cup method (Right two)

使用药敏片法和牛津杯法^[12]对 2 733 种中草药抑菌效果进行筛选,如图 4 所示。以抑菌圈的出

现为判定依据,发现五倍子、牡丹等中草药对耐药 PA 均有明显的抑菌作用,筛选结果见表 5。

表 5 2 733 种中草药抑菌筛选结果

Table 5 The screening results of bacteriostasis test on 2 733 Chinese herbal medicine

临床耐药菌株 Clinical resistant strain	有抑菌效果的中药 Chinese herbal medicine with antibacterial effect
#5336	五倍子、苈麻根、羊蹄甲、火炭母、叶下珠、水松、多花野牡丹、滨盐肤木、西青果、诃子、牡丹皮、白芍、红景天、椴子、榆绿木、假山龙眼
#5685	五倍子、滨盐肤木、西青果、诃子、苈麻根、羊蹄甲、火炭母、叶下珠、水松、牡丹皮、白芍、红景天、椴子、榆绿木、假山龙眼、丁香、马齿苋、赤芍

五倍子(*Gall Chinensis*)的主要成分为没食子酸酯类、黄芩苷类、蒽醌类和鞣皮素等,其中含量最高的为没食子酸酯类。其中没食子酸辛酯和 5EOE 的对接得分最低,说明没食子酸辛酯是耐药通路关键蛋白对接打分较优异的小分子。火炭母(*Polygonum chinense*)为蓼科植物。其主要化学成分为黄酮、酚酸、挥发油及甾体类,有较好的抑菌活性。Ouyang 等^[13]对此做过测试,结果显示,火炭母的抑菌活性物质存在于叶和茎中,且叶中提取液抑菌活性更高。其中邻苯二甲酸、3,3'-二甲基鞣花酸、山奈酚-3-O-葡萄糖醛酸苷与 4ZZL、5EOE 相关通路蛋白对接打分更低,对接效果更好,说明上述成分很可能是真正发挥作用的主要药效成分。叶下珠(*Phyllanthus urinaria*)又名珍珠草、阴阳草,属于大戟科植物。其主要化学成分可大致分为黄酮类、鞣质类、有机酸类、香豆素类、木质素类、多糖类等。其中 phyllanthusiin A 跟 4HEF 对接的打分最低,说明和该蛋白的对接效果更好,有望成为铜绿假单胞菌 QSI 的潜在药物。苈麻根、水松、多花野牡丹、羊蹄甲的作用与上述类似。

3 讨论与结论

PA 耐药问题日趋严重,这对临床上抗菌药物的治疗效果造成较大困扰。QS 系统在多种细菌尤其 PA 中普遍存在,系统间呈级联调控,调控细菌的致病性和耐药性。与传统抗生素相比,QSIs 可以在不影响细菌正常生长的前提下,仅在适当浓度时对靶细菌的 QS 系统产生抑制作用,降低细菌的毒力,以抑制细菌毒素扩散^[14]。本文所用的 5 个蛋白分别对应不同的通路蛋白。其中 5EOE 是 BEL-1 型蛋白,可生产灭活酶来破坏 β -内酰胺环,导致该类抗生素失活;4HEF 是头孢菌素水解酶复合物,归属于群体感应 LAS 子系统,其通过形成一个类 β -内酰胺酶的共价结合酶复合物,来抑制丝氨酸 β -内酰胺

酶,从而为其广谱抑制性能提供结构基础^[15];4ZZL 是 MexR-R21W 的突变体,是铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 多药外排泵操纵子的抑制因子,其中 DNA 结合损害突变导致多药耐药^[16]。4NR0 是为 PA 产生的一种 enoyl-ACP 还原酶,在毒力因子 3-oxo-C₁₂ HSL 的合成中发挥重要作用。3H78 是喹诺酮类假单胞菌信号生物合成酶突变体与邻氨基苯甲酸酯组成的复合物,是该菌体内生物合成的重要催化剂^[17],抑制该复合物可降低 PQS 系统毒力因子的产生,降低耐药性。

近年来,有研究表明,一些临床常用药物也具有 QSIs 活性。如阿司匹林作为传统的解热镇痛药被发现在 6 mg/mL 浓度时不影响 PA 的生长,同时对 QS 毒力因子(如弹性蛋白酶、绿脓菌素等)产生一定的抑制作用^[18]。驱虫药氯硝柳胺可以抑制 PA 毒力因子的产生以及生物膜的形成。除此之外,一些人工合成的药物也具有 QSIs 的性能。例如,以咪喃酮((5Z)-4-溴-5-(溴亚甲基)-3-丁基-2-(5H)-咪喃酮)为原型的人工合成衍生物,咪喃酮 C-30 能够抑制外排泵和毒力因子的表达,增加 PA 生物膜对抗生素的敏感性^[19]。但目前为止,这些研究几乎都只停留在实验室范畴,临床活性还有待进一步研究。

本文借助 MOE 软件,对 2 733 个常见中药材的活性成分进行虚拟筛选,得到了 7 种可能有耐药株抑制作用的中草药:五倍子、苈麻根、羊蹄甲、火炭母、叶下珠、水松、多花野牡丹。随后,对其进行相关抑菌验证,结果与分子对接的计算结果吻合,说明本次筛选具有一定合理性。本研究采用的计算机虚拟筛选法,具有成本低、效率高的特点。在传统药理实验中结合计算,可更高效率进行研究。但值得一提的是,有些中药在虚拟计算中没有得到,却在实际筛选中显出抗菌活性(如盐肤木、西青果、诃子等),说明本方法仍然相对粗放,存在偏差和遗漏,还需进行

改进。后期拟采用分子动力学模拟,分析体系的运动性以及抑制机理等重要科学问题。

关于本文筛选出的中草药,Chen 等^[20]观察到在一定情况下,五倍子对 PA 生物膜有一定的清除作用,甚至是完全清除;Song 等^[21]发现中药材火炭母提取物对 PA 的生长有一定的抑制作用,且其最低抑菌浓度为 15.63 mg/mL;Pandey 等^[22]通过体外抑菌试验发现,羊蹄甲(叶、茎皮及花)的提取物对 PA 有一定的抑菌作用。

本文的另一个目的是提供临床上应对抗生素耐药药的 PA 感染。现正与临床科室进行合作,以筛选出的中药为各个单方,煎煮后与阿莫西林、头孢他啶、左氧氟沙星进行联用,观察其治疗效果,取得一定进展。但临床中医师反馈提及,需较强效的中药复方,以期更好地预后。虽然大部分化合物处于生物活性研究或临床前研究阶段,进入临床试验阶段的化合物还比较少,未来还将具有很多的不确定性,但这些具有不同作用机制的化合物为研发人员提供了宝贵的经验和研究思路,使得新型抗菌药物的出现成为可能。QSIs 拥有良好的应用前景,并且目前已报道的 QSIs 还很有限,很有必要去研究真正适合人类使用的安全高效的 QSIs,解决医学上细菌耐药性这一难题。

参考文献

- Geethalakshmi R, Sundaramurthi JC, Sarada DVL. Antibacterial activity of flavonoid isolated from *Trianthema decandra* against *Pseudomonas aeruginosa* and molecular docking study of FabZ[J]. *Microb Pathogenesis*, 2018, 121:87-92.
- Kalia M, Yadav VK, Singh PK, et al. Designing quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* utilizing FabI: an enzymic drug target from fatty acid synthesis pathway[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(2):40-50.
- Soukarieh F, Williams P, Stocks MJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems as drug discovery targets: current position and future perspectives [J]. *J Med Chem*, 2018, 61:10385-10402.
- Anandapadamanaban M, Pilstal R, Andresen C, et al. Mutation-induced population shift in the MexR conformational ensemble disengages DNA binding: A novel mechanism for MarR family derepression [J]. *Structure*, 2016, 24:1311-1321.
- Lahiri SD, Mangani S, Durand-Reville T, et al. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclozation mechanism: Avibactam in complex with CTX-M-

- 15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2013, 57:2496-2505.
- 6 Wang HM, Huang ZZ, Li TM, et al. Research progress on related factors and intervention drugs against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation [J]. *Exp Lab Med (实验与检验医学)*, 2019, 37:771-773.
- 7 Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [J]. *Microbiology*, 2002, 148(1):87-102.
- 8 Lee J, Wu J, Deng YY, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9:339-343.
- 9 Pozzi C, De Luca F, Benvenuti M, et al. Crystal structure of the *Pseudomonas aeruginosa* BEL-1 extended-spectrum beta-lactamase and its complexes with moxalactam and imipenem [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2016, 60:7189-7199.
- 10 Bera AK, Atanasova V, Robinson H, et al. Structure of PqsD, a *Pseudomonas* quinolone signal biosynthetic enzyme, in complex with anthranilate [J]. *Biochemistry-US*, 2009, 48:8644-8655.
- 11 Liu Y, Shi J, Xiong YN. Virtual screening and identification of quorum sensing active substances targeting LasR protein [J]. *J North China Univ Sci Technol: Health Sci (华北理工大学学报:医学版)*, 2018, 20(1):11-15.
- 12 Zhao HY, Jiang FR, Chen XY, et al. Sensing of quorum sensing inhibitors from traditional Chinese herbal medicines on multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Guangxi Univ: Nat Sci (广西大学学报: 自科版)*, 2016, 41:2031-2038.
- 13 Ouyang PY, Zhu CX, Chen GX, et al. Preliminary study on the antibacterial activity of extracts from *Polygonum chinense* [J]. *Chem Bioeng (化学与生物工程)*, 2012, 29:37-40, 44.
- 14 Williams P, Camara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12:182-191.
- 15 Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(1):26-41.
- 16 Rasamiravaka T, El Jaziri M. Quorum-sensing mechanisms and bacterial response to antibiotics in *P. aeruginosa* [J]. *Curr Microbiol*, 2016, 73:747-753.
- 17 Bredenbruch F, Nimtz M, Wray V, et al. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187:3630-3635.